

## **Duplicação Cromossômica de Genótipos de Milho Visando a Obtenção de Híbridos Duplo-haploides<sup>1</sup>**

Evellyn Giselly de Oliveira Couto<sup>1</sup>, Tallyta Nayara Silva<sup>1</sup>, Guilherme Mendes Battistelli<sup>2</sup>, Fernanda de Oliveira Bustamante<sup>1</sup>, Livia Maria Chamma Davide<sup>3</sup> e Renzo Garcia Von Pinho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, tallytans@yahoo.com.br, evellyn.couto@yahoo.com.br, fobustamante@gmail.com, renzo@dag.ufla.br <sup>2</sup>Geneze Sementes, guilherme@geneze.com.br, <sup>3</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, liviadavide@ufgd.edu.br

**RESUMO** – Os duplo-haploides em milho tem se tornado importante em programas de melhoramento, principalmente por possibilitarem um ganho na obtenção de linhagens. Neste trabalho, objetivou-se comparar diferentes genótipos de milho quanto a resposta à duplicação cromossômica e verificar a eficiência do protocolo de duplicação. Para essa finalidade, foram cruzados 4 híbridos com a linhagem indutora PHI. As sementes que apresentavam embriões brancos e pericarpo com manchas arroxeadas foram selecionadas. Estas foram colocadas para germinar por 96 horas em estufa a 28°C. As plântulas foram então submetidas ao protocolo de duplicação da literatura com modificações. A frequência de indução de haploidia foi de 3,5% e a de duplicação foi baixa, visto que apenas 26,76% das plântulas responderam ao tratamento com colchicina. Considerando os híbridos, o mais responsivo à duplicação foi o P30F53. Concluiu-se que variações no protocolo devem ser realizadas, tais como mudanças no tempo e temperatura de incubação e concentração do antimitótico. Além disso, o emprego de outras metodologias que permitam confirmar com exatidão a ploidia das plantas deve ser incorporado nas pesquisas que envolvam duplo-haploides em milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., linhagens indutoras de haploidia, citometria de fluxo.

### **Introdução**

Várias empresas multinacionais já possuem uma metodologia bem estabelecida para a obtenção de linhagens duplo-haploides de milho, tendo inclusive híbridos lançados no mercado. Entretanto, o setor público e empresas nacionais de sementes só agora começam a atentar sobre as vantagens dessa tecnologia. Além disso, a adoção da tecnologia duplo-haploides em milho tropical está atrasada em relação ao clima temperado, devido à falta de indutores haploides tropicais, como também informações confiáveis sobre o desempenho de indutores temperados nas condições tropicais (PRIGGE et al., 2011).

Dentre as características vantajosas proporcionadas pelos duplo-haploides pode-se citar a máxima variação genética, a completa homozigose e a redução do tempo e custo envolvidos na obtenção das linhagens (GEIGER e GORDILLO, 2009).

A partir do primeiro indutor de haploidia gimnogenético em milho, a Stock 6 (COE, 1959), muitas linhagens indutoras foram criadas. A linhagem indutora RWS foi recentemente desenvolvida e caracterizada por Rober et al. (2005) e tem taxa de indução de 8-10%, enquanto que a linhagem PHI, que surgiu do cruzamento entre Stock 6 e MHI, chega a taxas

---

<sup>1</sup> Trabalho realizado pelo apoio do CNPq, Fapemig e Geneze Sementes.

de 14% de indução .

Esses indutores possuem genes marcadores de antocianina, o que possibilita a identificação das sementes haploides. O alelo marcador *RI-nj* (NANDA e CHASE, 1966) é amplamente utilizado para essa finalidade. Por meio dele é possível distinguir as sementes haploides, uma vez que elas possuirão embriões brancos e pericarpo arroxeadado, ao contrário das sementes diploides que possuirão embriões roxos. Entretanto, a expressão desse gene tem uma forte influência do sexo feminino, o que dificulta a seleção dos haploides, especialmente nos casos em que existe o gene inibidor *CI-1* . Quando o gene *CI-1* está presente ele inibe a expressão do alelo *RI-nj* e assim, os grãos ficam com a coloração branca impossibilitando a seleção dos haploides. Nesses casos, é necessário selecionar os haploides por meio da pigmentação causada pela expressão de dois outros genes, o *BI* e o *PII* (ROTARENCO et al., 2010).

Após a indução e identificação dos haploides é essencial o desenvolvimento de um protocolo eficiente de duplicação cromossômica. Isso porque a frequência de duplicação cromossômica espontânea em haploides de milho tem sido baixa e extremamente incerta (WAN et al., 1991).

Nesse contexto, objetivou-se neste trabalho analisar a resposta à duplicação cromossômica dos diferentes genótipos cruzados com o indutor de haploidia PHI e verificar a eficiência do protocolo de duplicação.

### **Material e Métodos**

A linhagem indutora de haploidia PHI (gimnogenética) foi cruzada com os híbridos 2B587, P30F35, P30F53 e 2B707. Dessas sementes foram selecionadas aquelas que apresentavam embriões brancos e pericarpo com manchas arroxeadas, causadas pela expressão do gene *R-navajo*.

As sementes do grupo selecionado foram colocadas para germinar por 96 horas em estufa à 28°C. Em seguida foram selecionadas as plântulas que apresentavam menores tamanhos de coleótilos e raízes, como também aquelas que não possuíam nenhuma coloração nas raízes, devido à expressão dos genes marcadores *BI* e *PII*. Todas as outras plântulas foram eliminadas.

A duplicação cromossômica foi realizada no Laboratório de Citogenética do DBI-UFLA. As sementes selecionadas foram imersas em solução de colchicina 0,06% e dimetilsulfóxido 0,5% (DMSO) por 12 horas no escuro (DEIMLING, 1997) e mantidas em

temperatura ambiente. Após a duplicação, as plântulas foram lavadas por 20 minutos em água corrente e então, levadas para casa de vegetação.

Para as análises em citometria de fluxo, foram coletadas amostras de plântulas no estágio de duas folhas. O preparo das amostras e as análises foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do DAG- UFLA. Foram avaliadas 71 plântulas. Para cada amostra, utilizou-se, aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens do indivíduo avaliado, juntamente com a mesma quantidade de *Vicia faba* (padrão interno de referência - 26,9 pg/2C). As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a obtenção da suspensão nuclear (Dolezel, 1997), a qual foi adicionada 2,5•L de RNase e corada com 25 µL de iodeto de propídeo ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Para cada amostra foram analisados pelo menos 10.000 núcleos. Os histogramas foram obtidos no citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest (Becton, Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no software WinMDI 2.8 (2009).

### **Resultados e Discussão**

Das plantas do grupo selecionado apenas 71 foram analisadas em citômetro de fluxo, uma vez que os genes marcadores *B1* e *P11*, como também o tamanho das raízes e coleóptilos permitiram uma maior seleção dos prováveis haploides. Por meio desses outros marcadores a possibilidade de selecionar sementes diploides é reduzida.

A frequência de indução de haploidia foi de 3,5%, indicando um valor mais baixo que o apresentado na literatura, segundo a qual a porcentagem de duplicação do indutor PHI é 14%. Esse valor pode ser explicado pelas restrições impostas pelo ambiente, uma vez que a linhagem indutora utilizada é temperada e os cruzamentos desse experimento foram conduzidos em clima tropical.

A tabela 1 apresenta as porcentagens de mixoploides detectados pela citometria de fluxo, como também a porcentagem de haploides e diploides que não responderam à duplicação cromossômica. É visto que 57,75 % dos haploides selecionados não responderam ao protocolo de duplicação utilizado. Apenas 26,76% das plântulas foram responsivas ao protocolo, um valor baixo para ser utilizado em programas de melhoramento. É possível observar também que 15,5% das plântulas selecionadas correspondem a indivíduos diploides.

Dentre os híbridos analisados pode-se perceber que o mais responsivo ao protocolo de duplicação, de acordo com a técnica de citometria de fluxo, foi o P30F53, indicando que a resposta do genótipo à duplicação cromossômica é importante na obtenção de duplo-

haploides.

Um dos procedimentos que pode ter causado pouca resposta à duplicação cromossômica por parte dos genótipos é a temperatura. Na metodologia as plântulas foram imersas em colchicina e deixadas no escuro em temperatura ambiente, de 21°C. Esta temperatura foi diferente da usada por Deimling e colaboradores em 1997 (18°C), e isto indica a sua importância nos procedimentos de duplicação, sendo necessários novos testes.

De acordo com Castillo et al. (2009), a indução *in vivo* em plântulas de milho é dificultada pela inacessibilidade ao meristema. A aplicação de bloqueadores mitóticos em plântulas causa alta taxa de mortalidade, de 20 a 30% (RoBER et al., 2005), como também ocorre produção de plantas mixoploides e quiméricas frequente quando o bloqueador é efetivo.

Os histogramas obtidos por citometria de fluxo podem ser observados na figura 1. Eles evidenciam a presença de mixoploides, haploides que não foram duplicados e diploides que também não se duplicaram. Os diploides detectados na citometria de fluxo comprovam a dificuldade de selecionar somente sementes haploides por meio dos marcadores morfológicos. Além disso, os haploides e diploides dos gráficos permitem concluir também a necessidade de modificar o protocolo de duplicação cromossômica utilizado.

### **Conclusões**

O genótipo P30F53 apresentou maior resposta à duplicação cromossômica, quando comparado com os outros.

É necessário ficar atento quanto à temperatura utilizada no protocolo de duplicação cromossômica.

A publicação de protocolos de duplicação cromossômica torna-se cada vez mais importante, uma vez que estes estão em sua maioria retidos em empresas multinacionais.

### **Literatura Citada**

COE, E.H. A line of maize with high haploid frequency. *American Naturalist*, Chicago, v. 93, p. 381-382, 1959.

GEIGER, H.H.; GORDILLO, G.A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, v. 54, p. 485-499, 2009.

NANDA, D.K.; CHASE, S.S. An embryo marker for detecting monoploids of mayze (*Zea mays* L.). *Crop Science*, Madison, v. 6, p. 213-215, 1966.

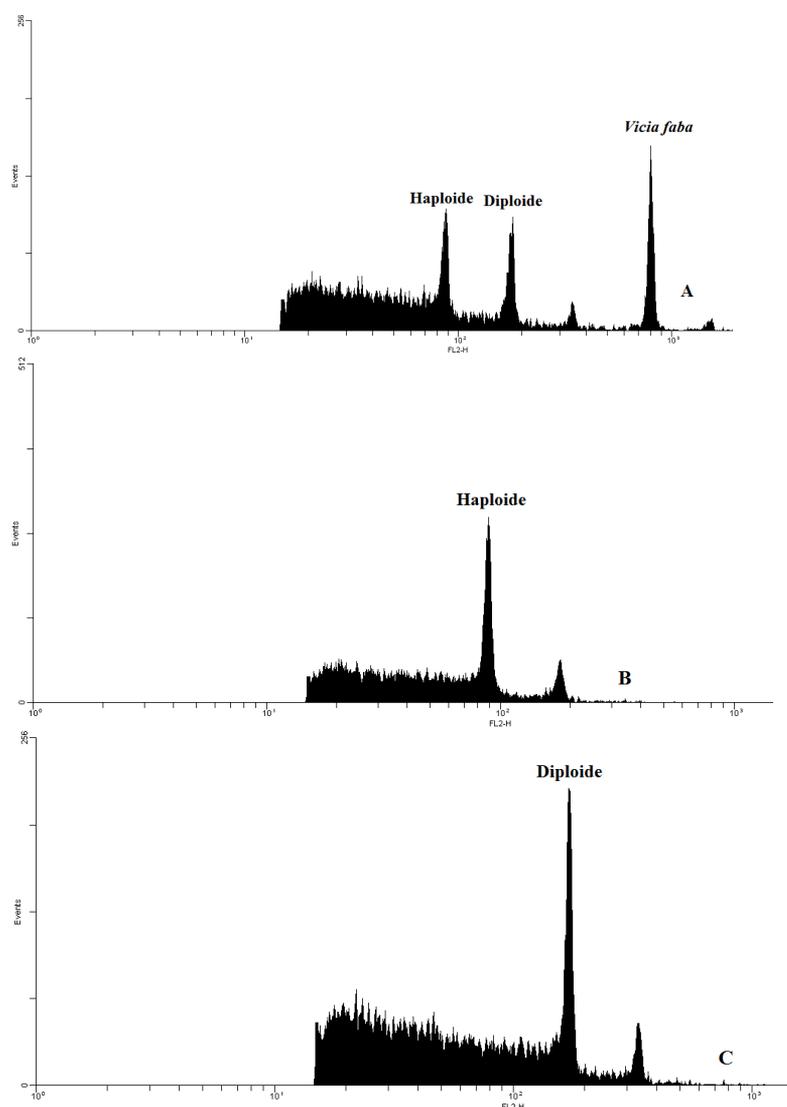
PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B.S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J.L.; BÄNZIGER, M.; MELCHINGER, A.E. Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of

inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. *Crop Sci.*, v. 51, p. 1498-1506, 2011.

ROBER F.K.; GORDILLO, G.A.; GEIGER, H.H. In vivo haploid induction in maize - Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, v. 50, p. 275-283, 2005.

ROTARENCO, V.; DICU, G.; STATE, D.; FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, v. 84, 2010.

WAN, Y.; DUNCAN, D.R.; RAYBURN, A.L. et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled-haploid plants from anther derived maize callus. *Theoretical Applied and Genetics*, v.81, p. 205-211, 1991.



**Figura 1.** Histogramas de citometria de fluxo em folhas jovens de milho. A) Mixoploidia. Estimativa da quantidade de DNA de 2,93pg (CV = 0,54%) no primeiro pico e 6,01pg (CV= 0,46%) no segundo pico. B) Haploide. Estimativa da quantidade de DNA de 3,01pg (CV= 0,69%). C) Diploide. Estimativa de quantidade de DNA de 5,85 pg (CV = 0,49%). Eixo vertical = número de núcleos lidos; eixo horizontal = intensidade de fluorescência relativa.

**Tabela 1.** Resposta das plântulas ao protocolo de duplicação cromossômica (em porcentagem).

	Total de Plântulas	%
Haploide	41	57,75
Diploide	11	15,50
Mixoploide	19	26,76
Total	71	100